

CO

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-194378

(43)Date of publication of application : 01.08.1995

(51)Int.Cl.

C12N 9/96

(21)Application number : 05-352287

(71)Applicant : FUJI SEITO KK

(22)Date of filing : 28.12.1993

(72)Inventor : YOSHINAGA KOICHI  
URITANI MASAHIRO  
ISHIKAWA KATSUTOSHI  
KUBOTA SATOO  
WADA TADASHI  
OGUCHI MASAHIKA

## (54) METHOD FOR STABILIZING ENZYME BY TREHALOSE

## (57)Abstract:

PURPOSE: To make it possible to store an unstable restriction enzyme at a normal temperature by dissolving a restriction enzyme in a buffer solution containing Tris-HCl and the other component and then, adding trehalose in a specific amount to the solution.

CONSTITUTION: Trehalose is added to an enzyme solution obtained by dissolving a restriction enzyme such as Hind III in a buffer solution containing Tris-HCl and the other component such as glycerol. The activity of the restriction enzyme is maintained for  $\geq 200$  hr at  $37^{\circ}$  C when the concentration of the trehalose is  $\geq 3$ w/w%.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2003 Japan Patent Office

CO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-194378

(43) 公開日 平成7年(1995)8月1日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 9/96

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 3 頁)

(21) 出願番号	特願平5-352287	(71) 出願人	591024270 フジ製糖株式会社 静岡県清水市清開 1 丁目 4 番10号
(22) 出願日	平成 5 年(1993)12月28日	(72) 発明者	吉永 光一 静岡県焼津市坂本411-6
		(72) 発明者	瓜谷 真裕 静岡県静岡市小島906
		(72) 発明者	石川 勝利 静岡県藤枝市瀬戸1990-10
		(72) 発明者	程田 悟夫 静岡県静岡市池田1004
		(74) 代理人	弁理士 石原 庸男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トレハロースによる酵素の安定化法

(57) 【要約】

【目的】 不安定な制限酵素を安定化させて、利用性を高める方法を提供する。

【構成】 酵素をTris-HCl、その他とからなる緩衝液に溶解させた酵素保存溶液に 3 w/w%以上のトレハロースを添加して酵素液とすることを特徴とするトレハロースによる酵素の安定化法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵素をTris-HCl、その他とからなる緩衝液に溶解させた酵素保存溶液に3 w/w%以上のトレハロースを添加して酵素液とすることを特徴とするトレハロースによる酵素の安定化法。

【請求項2】 酵素液を調整した後、これを濃縮して所望の濃度の酵素液とすることを特徴とする請求項1記載のトレハロースによる酵素の安定化法。

【請求項3】 酵素液には、5%以上、又はトレハロースの0.1~2倍量のグリセロールを添加することを特徴とする請求項1、又は2記載のトレハロースによる酵素の安定化法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、緩衝液に溶解した状態で保管され、使用されている不安定な酵素の安定性を高める方法に関し、特に酵素保存溶液にトレハロースを添加することにより、酵素を安定化すると共に、これを水分の含有量が5%程度以下になるまで濃縮することを可能にしたことを特徴とするものである。

## 【0002】

【従来の技術】 一般に酵素は、生体内にあって、生体内で特定な分子やその配列、或いは特定なラジカルに反応して、これを切断したり、結合させたり、組み替えたりする機能を有している。近年は、生物体から酵素を抽出して、生体内でだけ作られていた物質を人工的に合成したり、医薬品その他の新たな有用物質を創り出そうとする試みがなされている。例えば、制限酵素は、DNAの塩基配列を認識し、これを切断する機能を有する酵素であって、現在Hind III、EcoR I、BamH I、その他約2000種ほどが確認されている。これらの酵素は、それぞれがDNAの塩基配列の認識する部位が異なっていて、DNAの或る特定な塩基配列を認識して、それを切断する。そのため、適当な酵素を選択して使用することにより、DNAの所望の箇所を切断することが出来るので、遺伝子工学に欠かせないものとなっている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 ところが、これらの酵素の多くは生体から抽出した状態では極めて不安定で失活し易く、殊に、乾燥や高温、凍結などに対して殆んど抵抗力が無く、短時間で失活するため緩衝溶液にして常に所定の温度に保って、取り扱われている。然し酵素は、そのようにしてもなお安定性が低いため、その機能を充分に発揮させることが出来ない、と云う問題がある。例えば制限酵素では、不凍液の役割を果たすグリセロール(50%)を含む緩衝溶液にして、-20℃に冷却しておくこととされている。そのため制限酵素は、取り扱いや保存が面倒であって、保管装置を要する上に、これを運搬したり輸送したりする際には特定な冷却容器を必要とするなどの問題がある。本発明は、上記した不安定

な制限酵素を安定化させて、利用性を高める方法に関するものである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は、酵素を所定の緩衝液に溶解させた酵素保存溶液にトレハロースを添加して酵素液とすることにより、酵素を安定化することを特徴とするものである。酵素溶液中のトレハロースの濃度が3%程度以上になると、酵素が安定化し、37℃で200時間以上活性が持続される。トレハロースは、粉体の状態のままで、或いは予じめ適度な濃度の溶液にして酵素保存溶液に添加することにより、酵素保存溶液中のトレハロースの濃度を調整することができる。又、酵素保存溶液中に一旦トレハロースを添加した後、水分を乾燥させて、これを水飴状、或いは粉体状になるまで濃縮することが出来る。

## 【0005】

【実施例1】 以下、本発明に係るトレハロースによる酵素の安定化法を制限酵素に適用した実施例に基づいて具体的に説明する。尚、本発明においては酵素の残存活性は、アガロースゲル電気泳動法により測定した。制限酵素・HindIII 1200 unit/ml、Tris-HCl (pH 7.5) 10mM、KCl 200mM、2-ME (2-mercaptoethanol) 10mM、EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0.1mM、BSA (Bovine serum albumine) 0.01%、及びグリセロール 5%とからなる酵素保存溶液に20 w/w%のトレハロースを添加して酵素液を調整した。この酵素液を37℃で200時間放置した後、酵素の活性を測定したところ、その活性は酵素液を調整した直後のものと殆んど同一であった。又、この酵素保存溶液に10 w/w%のトレハロースを添加して酵素液を調整し、これを10~40℃にて、 $1 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^2$  mmHgの減圧下で、水分の最終の含有量が5%程度になるまで濃縮すると共に、夫々の濃縮段階の酵素液について、上記と同様の条件で酵素の活性を測定した。その結果酵素液は、トレハロースの濃度が10%程度以上に濃縮されると、その活性が酵素液を調整した直後のものと殆んど同一になった。上記酵素液に、トレハロースの添加量の15~30%のグリセロールを添加して酵素液を調整し、これを10~40℃にて、 $1 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^2$  mmHgの減圧下で、水分を濃縮したところ、酵素液は水分の含量が10%程度以下になると、含量が減少するに従って次第に粘度が上昇し、更に濃縮が進んで水分の含量が5~4%程度にまで減少すると、水飴状、又はソポロ状になった。夫々の濃縮度の酵素液を37℃で200時間放置した後、酵素の活性を測定したところ、酵素液中のグリセロールの濃度によっては酵素の活性に影響が認められず、その活性は酵素液を調整した直後のものと殆んど同一であった。

## 【0006】

【実施例2】 制限酵素・Pst I 1200 unit/ml、Tris-HCl (pH 7.5) 10mM、KCl 200mM、2-ME 10mM、EDT

A0.1mM、BSA 0.01%、グリセロール 5%とからなる酵素保存溶液にトレハロース 10~60 w/w%を添加して酵素液を調整した。この酵素液を37℃で200時間放置した後、酵素の活性を測定したところ、トレハロースの添加量が30 w/w%以上のものは、活性が酵素液を調整した直後のものと殆んど同一になった。又、この酵素保存溶液に20 w/w%のトレハロースを添加して酵素液を調整し、これを10~40℃にて、 $1 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^2$  mmHgの減圧下で、水分の最終の含有量が5%程度になり、液が水飴状になるまで濃縮すると共に、夫々の濃縮段階の酵素液について、上記と同様の条件で酵素の活性を測定した。その結果酵素液は、トレハロースの濃度が60 w/w%程度以上に濃縮されると、その活性が酵素液を調整した

直後のものと殆んど同一になった。

【0007】

【発明の効果】以上詳述したように本発明は、安定性が極めて低いため、50%程度のグリセロールを含む緩衝溶液にして、-20℃程度に冷却しておくこととされていた酵素保存溶液に数%以上のトレハロースを添加するもので、その操作が極めて簡単な上、酵素の安定性が著しく向上し、常温でも保存することが可能になった。その結果、特定の冷却容器を必要とするなどの問題がなくなり、一定の活性を有する酵素を使用することが出来るようになったのである。殊に、酵素液を、水分の含量が数%程度になるまで濃縮することが可能となったため、酵素の取り扱いが一段と簡易になったのである。

フロントページの続き

(72)発明者 和田 正

熊本県熊本市花園3-5-10

(72)発明者 大口 真央

静岡県静岡市登呂4丁目25番8号

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-194378

(43)公開日 平成7年(1995)8月1日

(51)IntCl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 9/96

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 3 頁)

(21)出願番号 特願平5-352287

(22)出願日 平成5年(1993)12月28日

(71)出願人 591024270

フジ製糖株式会社

静岡県清水市清開1丁目4番10号

(72)発明者 吉永 光一

静岡県焼津市坂本411-6

(72)発明者 瓜谷 真裕

静岡県静岡市小鹿906

(72)発明者 石川 勝利

静岡県藤枝市瀬戸1990-10

(72)発明者 窪田 悟夫

静岡県静岡市池田1004

(74)代理人 弁理士 石原 庸男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トレハロースによる酵素の安定化法

(57)【要約】

【目的】 不安定な制限酵素を安定化させて、利用性を高める方法を提供する。

【構成】 酵素をTris-HCl、その他とからなる緩衝液に溶解させた酵素保存溶液に 3 w/w%以上のトレハロースを添加して酵素液とすることを特徴とするトレハロースによる酵素の安定化法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 酵素をTris-HCl、その他とからなる緩衝液に溶解させた酵素保存溶液に3 w/w%以上のトレハロースを添加して酵素液とすることを特徴とするトレハロースによる酵素の安定化法。

【請求項2】 酵素液を調整した後、これを濃縮して所望の濃度の酵素液とすることを特徴とする請求項1記載のトレハロースによる酵素の安定化法。

【請求項3】 酵素液には、5%以上、又はトレハロースの0.1~2倍量のグリセロールを添加することを特徴とする請求項1、又は2記載のトレハロースによる酵素の安定化法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、緩衝液に溶解した状態で保管され、使用されている不安定な酵素の安定性を高める方法に関し、特に酵素保存溶液にトレハロースを添加することにより、酵素を安定化すると共に、これを水分の含有量が5%程度以下になるまで濃縮することを可能にしたことを特徴とするものである。

## 【0002】

【従来の技術】 一般に酵素は、生体内にあって、生体内で特定な分子やその配列、或いは特定なラジカルに反応して、これを切断したり、結合させたり、組み替えたりする機能を有している。近年は、生物体から酵素を抽出して、生体内でだけ作られていた物質を人工的に合成したり、医薬品その他の新たな有用物質を創り出そうとする試みがなされている。例えば、制限酵素は、DNAの塩基配列を認識し、これを切断する機能を有する酵素であって、現在Hind III、EcoR I、BamH I、その他約2000種ほどが確認されている。これらの酵素は、それぞれがDNAの塩基配列の認識する部位が異なっていて、DNAの或る特定な塩基配列を認識して、それを切断する。そのため、適当な酵素を選択して使用することにより、DNAの所望の箇所を切断することが出来るので、遺伝子工学に欠かせないものとなっている。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 ところが、これらの酵素の多くは生体から抽出した状態では極めて不安定で失活し易く、殊に、乾燥や高温、凍結などに対して殆んど抵抗力が無く、短時間で失活するため緩衝溶液にして常に所定の温度に保って、取り扱われている。然し酵素は、そのようにしてもなお安定性が低いため、その機能を十分に発揮させることが出来ない、と云う問題がある。例えば制限酵素では、不凍液の役割を果たすグリセロール(50%)を含む緩衝溶液にして、-20℃に冷却しておくこととされている。そのため制限酵素は、取り扱いや保存が面倒であって、保管装置を要する上に、これを運搬したり輸送したりするには特定な冷却容器を必要とするなどの問題がある。本発明は、上記した不安定

な制限酵素を安定化させて、利用性を高める方法に関するものである。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明は、酵素を所定の緩衝液に溶解させた酵素保存溶液にトレハロースを添加して酵素液とすることにより、酵素を安定化することを特徴とするものである。酵素溶液中のトレハロースの濃度が3%程度以上になると、酵素が安定化し、37℃で200時間以上活性が持続される。トレハロースは、粉体の状態のままで、或いは予じめ適度な濃度の溶液にして酵素保存溶液に添加することにより、酵素保存溶液中のトレハロースの濃度を調整することができる。又、酵素保存溶液中に一旦トレハロースを添加した後、水分を乾燥させて、これを水飴状、或いは粉体状になるまで濃縮することが出来る。

## 【0005】

【実施例1】 以下、本発明に係るトレハロースによる酵素の安定化法を制限酵素に適用した実施例に基づいて具体的に説明する。尚、本発明においては酵素の残存活性は、アガロースゲル電気泳動法により測定した。制限酵素・HindIII 1200 unit/ml、Tris-HCl (pH 7.5) 10mM、KCl 200mM、2-ME (2-mercaptoethanol) 10mM、EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) 0.1mM、BSA (Bovine serum albumine) 0.01%、及びグリセロール 5%とからなる酵素保存溶液に20 w/w%のトレハロースを添加して酵素液を調整した。この酵素液を37℃で200時間放置した後、酵素の活性を測定したところ、その活性は酵素液を調整した直後のものと殆んど同一であった。又、この酵素保存溶液に10 w/w%のトレハロースを添加して酵素液を調整し、これを10~40℃にて、 $1 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^2$  mmHgの減圧下で、水分の最終の含有量が5%程度になるまで濃縮すると共に、夫々の濃縮段階の酵素液について、上記と同様の条件で酵素の活性を測定した。その結果酵素液は、トレハロースの濃度が10%程度以上に濃縮されると、その活性が酵素液を調整した直後のものと殆んど同一になった。上記酵素液に、トレハロースの添加量の15~30%のグリセロールを添加して酵素液を調整し、これを10~40℃にて、 $1 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^2$  mmHgの減圧下で、水分を濃縮したところ、酵素液は水分の含有量が10%程度以下になると、含量が減少するに従って次第に粘度が上昇し、更に濃縮が進んで水分の含量が5~4%程度にまで減少すると、水飴状、又はソボロ状になった。夫々の濃縮度の酵素液を37℃で200時間放置した後、酵素の活性を測定したところ、酵素液中のグリセロールの濃度によっては酵素の活性に影響が認められず、その活性は酵素液を調整した直後のものと殆んど同一であった。

## 【0006】

【実施例2】 制限酵素・Pst I 1200 unit/ml、Tris-HCl (pH 7.5) 10mM、KCl 200mM、2-ME 10mM、EDT

A0.1mM、BSA 0.01%、グリセロール 5%とからなる酵素保存溶液にトレハロース 10~60 w/w%を添加して酵素液を調整した。この酵素液を37℃で200時間放置した後、酵素の活性を測定したところ、トレハロースの添加量が30 w/w%以上のものは、活性が酵素液を調整した直後のものと殆んど同一になった。又、この酵素保存溶液に20 w/w%のトレハロースを添加して酵素液を調整し、これを10~40℃にて、 $1 \times 10^{-4} \sim 4 \times 10^2$  mmHgの減圧下で、水分の最終の含有量が5%程度になり、液が水飴状になるまで濃縮すると共に、夫々の濃縮段階の酵素液について、上記と同様の条件で酵素の活性を測定した。その結果酵素液は、トレハロースの濃度が60 w/w%程度以上に濃縮されると、その活性が酵素液を調整した

直後のものと殆んど同一になった。

【0007】

【発明の効果】以上詳述したように本発明は、安定性が極めて低いため、50%程度のグリセロールを含む緩衝溶液にして、-20℃程度に冷却しておくこととされていた酵素保存溶液に数%以上のトレハロースを添加するもので、その操作が極めて簡単な上、酵素の安定性が著しく向上し、常温でも保存することが可能になった。その結果、特定な冷却容器を必要とするなどの問題がなくなり、一定の活性を有する酵素を使用することが出来るようになったのである。殊に、酵素液を、水分の含量が数%程度になるまで濃縮することが可能となったため、酵素の取り扱いが一段と簡易になったのである。

フロントページの続き

(72)発明者 和田 正

熊本県熊本市花園3-5-10

(72)発明者 大口 真央

静岡県静岡市登呂4丁目25番8号